Beitrag zur Kenntnis der Inhaltsstoffe von Adonis vernalis

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der philosophischen Doktorwürde

vorgelegt der

Philosophisch-naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Basel

von

HANS ROSENMUND

aus Liestal, Bld.

CITY-DRUCK AG., ZÜRICH 1

1942

Beitrag zur Kenntnis der Inhaltsstoffe von Adonis vernalis

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der philosophischen Doktorwürde

vorgelegt der

Philosophisch-naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Basel

von

HANS ROSENMUND

aus Liestal, Bld.

CITY–DRUCK AG., ZÜRICH 1

1942

Genehmigt von der

Philosophisch-naturwissenschaftlichen Fakultät

Auf Antrag der Professoren

T. REICHSTEIN und K. LEUPIN

Basel, den 2. Juli 1942.

Prof. Dr. A. PORTMANN

Dekan.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Separatabdruck aus:

„Pharmaceutica Acta Helvetiae" **15**, 150, 1940; **17**, 176, 1942.

Die vorliegende Arbeit wurde in der
Pharmazeutischen Anstalt der Universität Basel
ausgeführt

Meinem hochverehrten Lehrer
Herrn Professor T. REICHSTEIN
bin ich für die freundliche Unterstützung
und Förderung der Arbeit
zu herzlichstem Dank verpflichtet.

Meinen lieben Eltern

gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Seite

I. Einleitung 7

II. Eigene Untersuchungen 10

A. Untersuchung des chloroformlöslichen Anteils («Adonivernosid»-Fraktion) 10

B. Untersuchung des wasserlöslichen Anteils («Adonidosid»-Fraktion) . . 12

III. Experimenteller Teil 14

1. Trennung des «Adoverns» mit Chloroform-Wasser 14

2. Aufarbeitung des chloroformlöslichen Anteils 15

Isolierung von kristallisiertem Cymarin 15

Azetat des Glykosids 17

Spaltung des Glykosids 17

Untersuchung des Aglukons 17

Untersuchung des Zuckers 20

3. Trennung des wasserlöslichen Anteils («Adonidosid»-Fraktion) . . . 20

4. Aufarbeitung der «Fraktion B» 21

Isolierung des niedrig schmelzenden Azetats (Azetat des wirksamen Glykosids) 21

Verseifung des niedrig schmelzenden Azetats (Freies Glykosid) 22

Isolierung des hochschmelzenden Azetats 23

Verseifung des hochschmelzenden Azetats 24

5. Aufarbeitung der «Fraktion C» 24

Isolierung eines Azetats vom Smp. 122—124° 25

Isolierung eines Azetats vom Smp. 59—60° 25

Weitere Trennung der amorphen Anteile 26

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546710_0023

I. Einleitung

Die Ranunculacee Adonis vernalis L., eine ausdauernde, auf kalkhaltigem, sonnigem Boden wachsende, stellenweise auch in der Schweiz vorkommende Pflanze, die in verschiedenen Ländern als Cardiacum und Diureticum verwendet wird, gilt nach *Zörnig*[1] als eines der wertvollsten Herzgifte. Offizinell ist das blühende Kraut, das sofort nach dem Sammeln getrocknet und zur Stabilisierung seiner Wirkstoffe ½ Stunde lang auf 55—60° erhitzt wurde (Ph. H. V). Die Wurzeln, welche früher in sehr häufigem Gebrauch standen, werden heute kaum mehr verwendet, trotzdem sie nach *Bergholz*[2] in ihrer Wirkung nicht hinter derjenigen des Krautes zurückstehen, während sie nach *Schaub*[3] erheblich schwächer wirksam sein sollen.

Pharmakologisch wirkt die Droge auf die Herztätigkeit ähnlich stimulierend wie Digitalis; sie besitzt für Frösche ungefähr dieselbe Toxizität wie das Fingerhutblatt (*Schmidt*[4]), ist jedoch für den Menschen weniger giftig, wie dies aus dem Vergleich der Maximaldosis hervorgeht, die für Adonis 10mal höher liegt (2,0 g) als für Digitalis. Als besonderer Vorteil gegenüber Digitalis wird allgemein die gute Verträglichkeit der Adoniszubereitungen hervorgehoben. Gastrische Reizwirkungen, wie sie nach Verabreichung von Fingerhutpräparaten häufig eintreten, sind nur in sehr geringem Maße vorhanden *(Schmidt)*. Dies mag der Hauptgrund sein, weshalb heute die Droge in Rußland mehr verordnet wird als Digitalis *(Bergholz)*. Doch hat auch das russische Arzneibuch hiezu seinen Teil beigetragen, denn die UdSSR.-Pharmakopöe (1929) läßt die Droge an Hand eines Adonis-Standardpräparates biologisch auf einen festen Wirkungswert einstellen, was zur Erreichung einer konstanten Wirksamkeit unerläßlich ist, da der Wirkstoffgehalt der Droge starken Schwankungen unterliegt. In unserer Pharmakopöe fehlt die Vorschrift zur Standardisierung, und es ist deshalb nicht erstaunlich, wenn die Droge den Aerzten vielfach als unzuverlässig bekannt gemacht und das (im Handel standardisiert erhältliche) Digitalisblatt dem Adoniskraut meistens vorgezogen wird. Die Aufnahme biologischer Bestimmungsmethoden für die herzwirksamen Drogen wäre jedenfalls bei einer Neuauflage unserer Pharmakopöe im Interesse guter galenischer Herzmittel sehr wünschenswert. Ueber den Grad der diuretischen Wirksamkeit des getrockneten Krautes werden in der Literatur keine genauen Angaben gemacht. Hingegen wird die Wirkung der frischen Pflanze von *Chevalier*[5] und anderen ausdrücklich nicht

[1] *H. Zörnig*, Arzneidrogen I, p. 263 (Leipzig 1909).
[2] *M. Bergholz*, Sowjetskaja Pharmazija Nrn. 2 und 3 (Moskau 1930), zitiert nach *Schaub*[3].
[3] *C. Schaub*, Diss. Braunschweig 1933.
[4] *J. M. Schmidt*, Am. Journ. Pharm. *92*, 702 (1920).
[5] *J. Chevalier*, Z. Biochem. Biophys. *15*, 208 (1913).

als digitalis-, sondern als scillaähnlich bezeichnet, mit der Begründung, daß die Reizwirkung auf die Niere für das Wirkungsbild der Frischdroge wesentlich ist. Diese bedeutsame Feststellung läßt eine im Verlauf des Trocknungsprozesses eintretende Abnahme des diuretischen Effektes vermuten. Ob, bzw. wieweit dies tatsächlich der Fall ist, kann an Hand der bisherigen Veröffentlichungen nicht festgestellt werden, doch ist mit der Möglichkeit fermentativer Spaltungsprozesse und damit auch von Wirkungsänderungen bei derartig empfindlichen Stoffen, wie sie die Herzglykoside darstellen, durchaus zu rechnen, um so mehr, als solche Vorgänge auch bei anderen herzwirksamen Drogen (z. B. Bulbus Scillae oder Semen Strophanthi Kombé) bekannt sind.

Die glykosidische Natur der Adoniswirkstoffe wurde schon von *Cervello*[6] an dem von ihm 1882 hergestellten «Adonidin» erkannt, das in Anlehnung an die Vorschrift zur Herstellung des deutschen Digitalins über die Tanninverbindung isoliert und in Form eines amorphen, sehr stark bitter schmeckenden Pulvers erhalten wurde. Nach *Cervello* (l. c.) besitzt das «Adonidin» eine größere Wirksamkeit als Digitoxin, was *Heyl, Hart* und *Schmidt*[7] für das Handelspräparat «Merck» nicht bestätigt fanden, indem dieses nach ihren Angaben nur 100mal stärker wirkt als das Kraut. Ein konstanter Wirkungswert läßt sich für diese Produkte indessen nicht festsetzen, da die «Adonidine» des Handels sehr veränderliche Gemische darstellen (*Jung* und *Fontenaille*[8]). Nach *Hermann* und Mitarbeitern[9] ist die Wirkung des «Adonidins» qualitativ gleichartig wie diejenige des wäßrigen Drogenauszuges. Mittlere Dosen bewirken Vergrößerung der Diastole und Verstärkung der Systole (*Lassalle*[10]), nach toxischen Gaben führt es zum systolischen Herzstillstand. Im übrigen verursacht «Adonidin» wie die anderen Herzgifte eine Erhöhung des Blutdruckes und der Diurese (*Hermann* und Mitarbeiter). Die beruhigende Wirksamkeit des Adonisinfuses, der in Form der Bechterewschen Mixtur schon seit langem zur Herabsetzung gesteigerter Nervenerregbarkeit (Epilepsie, Hysterie, Geisteskrankheiten) verwendet wird, erfuhr durch die Untersuchungen von *Maßlow*[11] eine experimentelle Bestätigung, indem dieser nach Verabreichung von «Adonidin» eine Abschwächung der durch Kokain, Kampfer und Pikrotoxin erzeugbaren Krämpfe feststellen konnte. Damit wird wahrscheinlich auch die Herabsetzung der Giftigkeit von Kokain zusammenhängen, dessen Wirkung durch «Adonidin» interessanterweise um das 10fache verstärkt werden kann (*Gehe*[12]). Ein näheres Eingehen auf die pharmakologischen Eigenschaften des «Adonidins» erübrigt sich, um so mehr als dasselbe ein Substanzgemisch von nicht kontrollierbarer Zusammensetzung darstellt. Erwähnt werden mag noch ein Analysenresultat eines von *Mordagne*[13] auf ähnliche Weise erhaltenen Präparates, das nach

[6] *V. Cervello*, Arch. exp. Pathol. u. Pharmakol. *15*, 235 (1882).
[7] *F. W. Heyl, M. C. Hart, J. M. Schmidt*, Am. Soc. *40*, 436 (1918).
[8] *L. Jung* und *P. Fontenaille*, C. R. Soc. Biol. *98*, 1338 (1928).
[9] *H. Hermann, F. Jourdan, M. Ribere*, C. *1930* II, 942.
[10] *H. Lassalle*, C. R. Soc. Biol. *97*, 1530 (1927).
[11] *M. Maßlow*, Arch. exp. Pathol. u. Pharmakol. *111*, 114 (1926).
[12] *Gehe & Co. AG.*, C. 1929 I, 1238.
[13] *J. Mordagne*, Pharmaceut. Journ. and Transact. *16*, 145 (1885).

langem Trocknen eine «diffuse und strahlende» Kristallisation zeigte und bei der Verbrennung 42,6 % C und 7,5 % H ergab.

Durch Ausschütteln des mit Wasser versetzten alkoholischen Auszuges von Adonis aestivalis mit Petroläther, Aether und Chloroform erhielt *Kromer*[14] im Chloroformteil ein amorphes, bitter schmeckendes Produkt, das 60,1 % C und 7,8 % H enthielt und für das er die Formel $C_{25}H_{40}O_{10}$ aufstellte, in Anlehnung an ein von *Tahara*[15] aus Adonis amurensis isoliertes «amorphes Glykosid» der Zusammensetzung $C_{24}H_{40}O_9$, das pharmakologisch nicht identisch war mit dem von *Cervello* hergestellten Adonidin. *Fuckelmann*[16] zerlegte das Glykosidgemisch von Adonis vernalis in neutrales Adonidin und eine durch Bromwasser und einige Tropfen Mineralsäure ausfällbare Adonidinsäure, die im Gegensatz zum neutralen Adonidin haemolytisch wirkte. Während *Mercier*[17] das Resultat *Fuckelmanns* bezüglich neutrales Adonidin und Adonidinsäure bestätigen konnte, fand *Schaub*[18] in der Droge keinerlei haemolytisch wirkende Stoffe. 1918 isolierten *Heyl*, *Hart* und *Schmidt* (l. c.) aus Adonis vernalis eine Anzahl kristallisierter Substanzen nicht glykosidischer Natur und stellten dabei die Anwesenheit glykosidischer Wirkstoffe überhaupt in Frage. Einen Schritt weiter bildete die Aufteilung des Glykosidkomplexes in einen leicht chloroformlöslichen Anteil («Adonivernosid») und einen leicht wasserlöslichen Teil («Adonidosid») durch die Gebrüder *Mercier*[19] und durch *Karrer*[20]. Letzterem gelang es, die Wirksamkeit der Chloroformfraktion auf 300 FD., diejenige des wasserlöslichen Teils auf 600 FD. pro mg zu steigern (Digitoxin = 270—290 FD). Der pharmakologische Unterschied der beiden Fraktionen besteht nach *Mercier* und *Macary*[21] darin, daß das «Adonivernosid» durch eine digitalisähnliche Wirksamkeit (langsame aber beständige Fixation am Myocard), das «Adonidosid» durch eine ouabainähnliche Wirkung (schnelle aber flüchtige Fixation) ausgezeichnet ist. *Karrer* (l. c.) macht die «Adonivernosid»-Fraktion für die sedative und diuretische Wirkung verantwortlich, die Wirkung des «Adonidosids» bezeichnet er als strophantusartig. *Jung* und *Fontenaille* (l. c.) fanden, daß das «Adonidosid» in nicht toxischen Dosen eine Verlangsamung des Pulses bewirkt, diuretische Wirksamkeit konnten sie nicht nachweisen. Die minimale tödliche Dosis beträgt nach *Mercier* und *Macary*[22] bei intravenöser Zufuhr und einer Infusionsdauer von 30 Minuten: beim Hund 0,5—0,75 mg für die «Adonidosid»-Fraktion und 1,75 mg/kg für das «Adonivernosid». Bei subokzipitaler Verabfolgung liegt das Verhältnis umgekehrt (0,3—0,4 mg für «Adonivernosid», bzw. 0,5—0,6 mg/kg für «Adonidosid»). Die beiden Glykosidfraktionen stellen braun gefärbte, amorphe Gemische dar, spalten bei der Hydrolyse mit Säure Zucker ab und lassen sich nach *Mercier* durch die Farbreaktion mit konz. Salz-, bzw.

[14] *N. Kromer*, Arch. Pharmazie, *234*, 452 (1896).
[15] *J. Tahara*, B. *24* (3), 2579 (1891).
[16] *J. M. Fuckelmann*, Diss. Rostock 1911.
[17] *L. Mercier*, Z. Biochem. Biophys. *16*, 652 (1914).
[18] *C. Schaub* (l. c.).
[19] *L. J. Mercier* und *F. Mercier*, Rev. de Pharmacol. *1*, 87 (1927).
[20] *W. Karrer*, Festschrift für E. C. Barell, S. 240 (Basel 1936).
[21] *F. Mercier* und *S. Macary*, C. R. Soc. Biol. *124*, 745 (1937).
[22] *F. Mercier* und *S. Macary*, C. R. Soc. Biol. *124*, 459 (1937).

Schwefelsäure unterscheiden. Die Schwefelsäurereaktion ist besonders charakteristisch und, wie *Schaub* (l. c.) zeigen konnte, auch zur Bestimmung der Lokalisation der Glykoside in der Pflanze geeignet. Konzentrierte Schwefelsäure färbt sich auf Zusatz von «Adonivernosid» braun, mit «Adonidosid» lebhaft rot.

II. Eigene Untersuchungen

Im nachfolgenden wird über eigene Untersuchungen berichtet, die am Handelsprodukt «Adovern» durchgeführt wurden, da frische Droge nicht erhältlich war. Eine größere Menge «Adovernsubstanz» wurde zu diesem Zwecke von der Firma F. Hoffmann-La Roche & Cie. AG., Basel, zur Verfügung gestellt, wofür auch hier bestens gedankt sei. Dies Material ist durch Adsorption aus wäßriger Lösung an Kohle und Elution mit Methanol-Chloroform gewonnen[23]. Zur Vortrennung wurde es zunächst einer Verteilung zwischen Chloroform und Wasser unterworfen, wobei aus 25 g «Adovernsubstanz» 11,3 g wasserlösliche Anteile (ungefähr entsprechend der «Adonidosid»-Fraktion von *Mercier*, bzw. *Karrer*), sowie 11 g neutrale chloroformlösliche Anteile (ungefähr entsprechend der «Adonivernosid»-Fraktion von *Mercier*, bzw. *Karrer*) gewonnen wurden. Die fehlenden 2,7 g entsprechen hauptsächlich einer gewissen Menge von in Wasser und Chloroform unlöslichem Harz sowie etwas sauren Anteilen. Sowohl das wasserlösliche wie das chloroformlösliche Rohprodukt stellen hellbraune Harze von sehr bitterem Geschmack dar.

Wie im folgenden berichtet wird, gelang es, den Hauptträger der biologischen Wirkung aus der «Adonivernosid»-Fraktion in kristallisierter Form zu isolieren und als Cymarin zu identifizieren. Auch aus der «Adonidosid»-Fraktion ließ sich gerade vor Abschluß dieser Arbeit noch ein kristallisiertes, hochwirksames Glykosid isolieren, das aber chemisch noch nicht untersucht werden konnte. Weiter lieferte diese Fraktion außer zwei Nebenprodukten noch einen zweiten, zwar biologisch aktiven, aber viel schwächer wirksamen Stoff, der möglicherweise ein Aglukon darstellt.

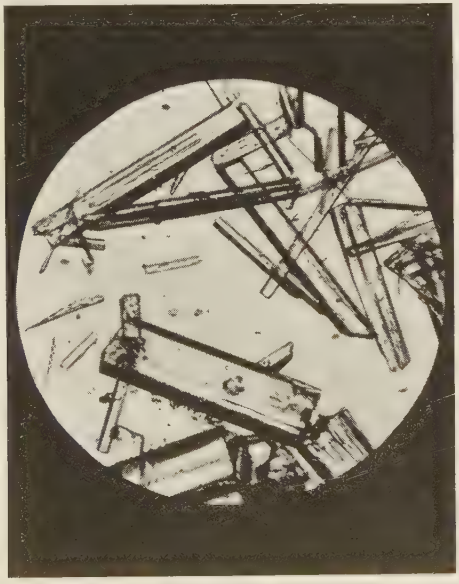
A. Untersuchung des chloroformlöslichen Anteils („Adonivernosid"-Fraktion)

Der chloroformlösliche Anteil wurde hierauf direkt einer chromatographischen Trennung über Aluminiumoxyd nach der Durchlaufmethode unterworfen. Aus 11 g chloroformlöslichen Anteilen ließen sich so 1,18 g eines einheitlichen Glykosids gewinnen, das aus Methanol in farblosen Nadeln kristallisierte (vgl. Abbildung), bei 132° schmolz und biologisch stark wirksam war. Es enthielt nach einer vorläufigen Bestimmung im Laboratorium der Firma F. Hoffmann-La Roche

[23] DRP. 480 410 (1926), 484 361 (1927).

& Cie. AG., Basel, etwa 1500 F. D. pro mg[24]. Da nach den genannten Angaben W. Karrers der chloroformlösliche Anteil des Adoverns etwa 200—300 F. D. pro mg enthält, so ist das isolierte Glykosid unzweifelhaft der Hauptträger der biologischen Wirkung dieses Anteils.

Die Untersuchung der Kristalle ergab, daß sie Kristall-Methanol und Wasser enthielten, die nur sehr schwer vollständig abgegeben werden. Daher sind Schlußfolgerungen aus den Verbrennungswerten des freien Glykosids nur mit Vorsicht zu verwenden. Hingegen erwies sich dasselbe auch nach sehr gutem Trocknen im Hochvakuum als methoxylhaltig. Die Spaltung des Glykosids mit verdünnter Schwefelsäure gab ein methoxylfreies, kristallisiertes Aglukon, das bei mikroskopischer Beobachtung auf dem Koflerblock bei 136—138° schmolz, sowie einen kristallisierten, ätherlöslichen und im Hochvakuum leicht sublimierbaren Zucker vom Smp. 88°, der als Cymarose identifiziert wurde und der somit für den Methoxylgehalt des Glykosids verantwortlich ist.



Cymarin aus Adonis vernalis[25]
(krist. Methanol)

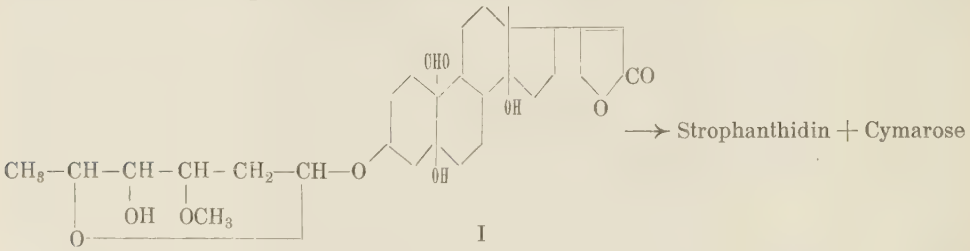
Zunächst schien es, daß das erhaltene Aglukon mit keinem bisher bekannten Stoff identisch wäre. Die Verbrennungswerte desselben sowie einiger Derivate zeigten aber, daß ihm die Bruttoformel $C_{23}H_{32}O_6$ zukommt. Dies entspricht der Zusammensetzung von Strophanthidin. Auch

[24] Die Prüfung wurde Ende Dezember 1939 an Grasfröschen (rana temporaria) nach der zeitlosen Methode Houghton-Straub ausgeführt, ohne Verwendung einer Kontrollsubstanz.

[25] Wir danken Herrn Prof. *K. Leupin* für die Ausführung der Mikroaufnahme.

die Drehung stimmt genau auf diesen Stoff. Lediglich im Smp. bestand eine große Differenz, denn in der Literatur[26] findet sich übereinstimmend die Angabe, daß Strophanthidin bei 170° unter Aufschäumen schmilzt (wasserfrei bei 235°)[27], während sich unser Aglukon schon bei 136° verflüssigte, worauf es öfters wieder erstarrte, um bei 220—230° endgültig zu schmelzen. Es wurde hierauf eine kleine Menge Strophanthidin aus Cymarin[28] bereitet. Ueberraschenderweise zeigte auch dieses Produkt nach mehrmaligem Umkristallisieren bei mikroskopischer Beobachtung auf dem Koflerblock immer den Smp. 136—138°, oftmals unter Wiedererstarren und erneutem Schmelzen bei 220—230°. Bei einer Kontrolle im gewöhnlichen Röhrchen zeigten beide Proben den in der Literatur erwähnten Smp. von 170° unter Aufschäumen. Die Mischprobe gab bei beiden Bestimmungsarten keine Schmelzpunkt-Erniedrigung. Die Identität des Aglukons mit Strophanthidin wurde schließlich noch durch Bereitung des Azetats und der iso-Verbindung sichergestellt.

Nach Aufklärung des Zucker- und Aglukon-Anteils war die Identifizierung des Glykosids selber leicht. Es war mit dem bekannten Cymarin (I)[29] identisch. Dies wurde durch direkten Vergleich der Glykoside und ihrer Monoazetate sichergestellt.



I
Cymarin

B. Untersuchung des wasserlöslichen Anteils („Adonidosid"-Fraktion)

Der wasserlösliche Anteil, der ungefähr der «Adonidosid»-Fraktion von *Mercier*, bzw. *Karrer* entspricht, wurde weiter durch Verteilung zwischen Wasser, Chloroform und Alkohol in zwei Teile zerlegt. Dies Verfahren ist von *Stoll* und Mitarbeitern[30] mit gutem Erfolg zur Trennung von stark wasserlöslichen Di- und Tri-glykosiden benützt worden. Die mit alkoholhaltigem Chloroform extrahierbaren Anteile bezeichnen wir als «Fraktion B», die auch hierbei in wäßriger Phase verbleibenden, stärkst wasserlöslichen Anteile als «Fraktion C».

[26] *A. Windaus* und *L. Hermanns*, Ber. *48*, 979 (1915).
[27] *A. Stoll, J. Renz* und *W. Kreis*, Helv. *20*, 1487 (1937).
[28] Das Material wurde uns von Herrn Dr. *W. A. Jacobs*, New York, zur Verfügung gestellt, wofür auch hier bestens gedankt sei.
[29] Formulierung des Laktonringes nach *W. D. Paist, E. R. Blout, F. C. Ukie, R. C. Elderfield*, J. organ. Chem. *6*, 273 (1941).
[30] *A. Stoll, J. Renz, W. Kreis*, Helv. *20*, 1487 (1937), ferner *A. Stoll, J. Renz*, Helv. *22*, 1193 (1939).

Die «Fraktion B», die etwa ein Drittel des wasserlöslichen Anteils («Adonidosid»-Fraktion) ausmachte, wurde hierauf mit Pyridin und Essigsäureanhydrid azetyliert und das azetylierte Material chromatographisch getrennt. Es gelang dabei, zwei Azetate in kristallisierter Form zu fassen. Das leichter eluierbare, tiefer schmelzende Azetat bildete farblose, zu Rosetten vereinigte Kristalle, die bei 146—148° schmolzen und eine spez. Drehung von $[\alpha]_D^{16} = -56{,}5° \pm 2°$ (Chloroform) besaßen. Sie gaben eine positive Legalprobe und zeigten mit konz. Schwefelsäure die nach *Karrer* für die «Adonidosid»-Fraktion charakteristische Rotfärbung. Es dürfte sich um das Azetat eines hochwirksamen Glykosids handeln. Die vorsichtige alkalische Verseifung mit Kaliumhydrogenkarbonat in wäßrigem Methanol bei Zimmertemperatur[31] ergab nämlich ein stark bitter schmeckendes Produkt, das voraussichtlich das freie Glykosid darstellt. Es wurde ebenfalls in schönen Kristallen vom Smp. 263—265° (Zers.) erhalten, die ähnliche Farbreaktionen gaben wie das Azetat. Die spez. Drehung betrug: $[\alpha]_D^{16} = -27° \pm 5°$ (Methanol). Während dieser Stoff in amorpher Form in Wasser recht leicht löslich ist, sind die Kristalle sowohl in Wasser als auch in Methanol relativ schwer löslich. Eine orientierende biologische Prüfung am Froschherz ergab, daß es sich um einen hochaktiven Stoff handelt, der dem Cymarin und Convallatoxin sowohl in Wirkungsstärke als auch in Wirkungsart sehr ähnlich ist[32]. Wir glauben, daß damit zumindest eine wichtige Komponente der «Adonidosid»-Fraktion isoliert ist. Die Prüfung, ob es sich um einen neuen oder bereits bekannten Stoff handelt, muß späteren Untersuchungen überlassen bleiben.

Das zweite, bei der chromatographischen Trennung etwas schwerer eluierbare Azetat, das aus der azetylierten «Fraktion B» erhalten wurde, kristallisierte in zu Drusen vereinigten Plättchen vom Smp. 237—238° (Zers.) und zeigte eine spez. Drehung von $[\alpha]_D^{14} = +30{,}4° \pm 3°$ (Chloroform). Auch dieses Azetat gab eine positive Legalprobe. Es wurde in gleicher Weise verseift. Der azetylfreie Grundkörper kristallisierte ebenfalls, schmolz bei 238—240° (Zers.) und zeigte eine spez. Drehung von $[\alpha]_D^{15} = +53° \pm 2°$ (abs. Alkohol). Auch dieser Stoff war biologisch wirksam, jedoch bedeutend schwächer als Cymarin, und die Wirkung entsprach eher der eines Genins. Es ist daher durchaus möglich, daß es sich um ein stark wasserlösliches Aglukon handelt, vielleicht sogar um dasjenige, das dem neu isolierten Glykosid entspricht.

Schließlich wurde auch die stärkst wasserlösliche «Fraktion C» azetyliert und chromatographisch getrennt. Dabei ließen sich nur zwei kristal-

[31] *T. Reichstein, J. v. Euw*, Helv. *21*, 1181 (1938). Diese Methode ist bisher zur Verseifung von Glykosidazetaten noch nicht angewendet worden. Sie dürfte auch für andere ähnliche Fälle geeignet sein, wo es sich darum handelt, alkaliempfindliche Azetate unbekannter Zusammensetzung zu verseifen, da ein Ueberschuß an Reagens nicht schädlich ist.

[32] Die biologische Prüfung wurde Anfang Mai 1942 im Laboratorium der Firma F. Hoffmann-La Roche & Cie. AG., Basel, an männlichen Grasfröschen (rana temporaria) nach der zeitlosen Methode von *Houghton-Straub* in der üblichen Weise unter Einsatz von 30 Fröschen durchgeführt.

lisierte Nebenprodukte in kleinen Mengen isolieren, die keine Legalprobe gaben und die nicht genauer untersucht wurden. Von den amorphen Anteilen wurden diejenigen, welche eine positive Legalprobe zeigten, vereinigt, mit Kaliumhydrogenkarbonat in wäßrigem Methanol verseift und das azetylfreie Material einer erneuten Auftrennung durch Verteilung zwischen Wasser—Chloroform sowie zwischen Wasser—Chloroform—Alkohol unterzogen. Der leichtest wasserlösliche Anteil gab etwas krist. Adonit. Aus den Anteilen, die in der Löslichkeit wieder der «Fraktion B» entsprachen, konnte durch erneute Azetylierung und Chromatographie noch eine geringe Menge Kristalle erhalten werden, die bei 168° schmolzen, bei der Mischprobe mit dem oben beschriebenen, bei 148° schmelzenden Azetat des hochaktiven Glykosids jedoch keine Schmelzpunktserniedrigung gaben.

Die Frage, ob die isolierten herzwirksamen Substanzen als solche in der Pflanze vorkommen oder ob es sich dabei bereits um Spaltprodukte handelt, kann vorläufig nicht entschieden werden. Dazu müßten Untersuchungen mit der frischen Droge vorgenommen werden, die momentan nicht zugänglich ist.

Der Firma *F. Hoffmann-La Roche & Cie. AG., Basel*, sei für die Ueberlassung von Adovernsubstanz sowie für die Ausführung der biologischen Bestimmungen vielmals gedankt.

III. Experimenteller Teil

(Alle Schmelzpunkte sind auf dem Koflerblock bestimmt und korrigiert.)

1. Trennung des „Adoverns“ mit Chloroform-Wasser

25 g «Adovern» wurden in der Reibschale grob gepulvert und im Scheidetrichter mit 500 cm^3 Chloroform und 250 cm^3 Wasser kräftig geschüttelt. Die Hauptmenge ging dabei in Lösung, während sich etwas klebriges, rotbraunes Harz an den Wänden absetzte. Die Chloroformlösung passierte hierauf drei weitere Scheidetrichter mit 125 cm^3 Wasser, wo sie jedesmal gut durchgeschüttelt wurde. Dann wurde noch dreimal mit je 250 und zweimal mit je 150 cm^3 Chloroform in der gleichen Reihenfolge wie oben ausgeschüttelt.

Die Wasserauszüge wurden vereinigt und, da sie auf Lakmus neutral reagierten, direkt im Vakuum eingedampft. Es blieb ein Rückstand von 11,3 g als hellbraunes Harz (wasserlösliches Rohglykosid).

Die Chloroformlösungen wurden vereinigt, viermal mit Sodalösung, zweimal mit Wasser ausgeschüttelt, mit Natriumsulfat getrocknet und im reduzierten Vakuum eingedampft. Der Rückstand wog 11 g (neutrales chloroformlösliches Rohglykosid). Das an den Wänden des ersten Scheidetrichters klebende rotbraune Harz wurde mit Methylalkohol abgelöst. Die Lösung hinterließ beim Eindampfen 2,9 g, die verworfen wurden.

2. Aufarbeitung des chloroformlöslichen Anteils („Adonivernosid"-Fraktion)

Isolierung von kristallisiertem Cymarin

11 g neutrales, chloroformlösliches Rohglykosid wurden mit 1 Liter heißem Benzol gut aufgeschüttelt, wobei ein großer Teil in Lösung ging. Dann wurde abgekühlt, absitzen gelassen und die überstehende Lösung über eine mit abs. Benzol bereitete Säule von 330 g Aluminiumoxyd (Merck, standardisiert nach Brockmann) filtriert. Es wurde mit je 1 Liter der in der Tabelle genannten Lösungsmittel nachgewaschen, worauf zuerst jeweils die im Kolben noch verbliebenen unlöslichen Reste wie oben heiß angeschlemmt wurden. Die letzten Anteile gingen erst bei Zusatz von Chloroform in Lösung. Die Filtrate wurden im reduzierten Vakuum eingedampft.

Fraktions-Nr.	Lösungsmittel	Eindampfrückstand des Filtrats nach Zusatz von etwas Methanol und evtl. Impfen
1	abs. Benzol	braunes Harz + wenig Kristalle
2	» »	» » + » »
3	» »	» » + » »
4	Äther-Benzol (1 : 4)	» » + » »
5	» » (1 : 4)	» » —
6	Chloroform-Benzol (1 : 9)	wenig » » —
7	» » (1 : 1)	viel » » —
8	» » (1 : 1)	» » —
9	» » (1 : 1)	» » —
10	» » (1 : 1)	» » —
11	» » (1 : 1)	wenig » » —
12	» » (1 : 1)	mit Methanol Kristalle
13	» » (1 : 1)	» » »
14—21	» » (1 : 1)	» »
22	Chloroform (500 cm³)	viel
23	» (500 cm³)	wenig
24	» (500 cm³)	braunes Harz
25—31	» (500 cm³)	»
32	Methanol-Chloroform (1 : 9)	viel gelbes
33	» » (3 : 7)	
34—36	» » (3 : 7)	wenig

Die Fraktionen 1 und 2 enthielten neben braunem Harz wenig hellgelbe Kristalle, die sich als Schwefel erwiesen.

Die Fraktionen 3 und 4 enthielten kleine Mengen von Kristallen, die nicht weiter untersucht wurden.

Die Fraktionen 6—10 kristallisierten nicht und wogen zusammen 1,15 g.

Die Fraktionen 12—23 kristallisierten nach Zusatz von etwas Methanol entweder spontan oder nach Impfen mit Kristallen aus Nebenfraktionen. Nach zweistündigem Stehen wurde mit etwas Benzol verdünnt, abgenutscht und mit einer Mischung von 95% Benzol und 5% Methanol, dann mit Aether gewaschen. Erhalten wurden total 0,96 g hellgelblicher Nadeln, die

alle bei etwa 130—134° schmolzen. Die vereinigten Mutterlaugen lieferten nach dem Eindampfen in gleicher Weise noch 223 mg derselben Reinheit. Die Ausbeute betrug somit total 1,183 g. Die verbliebenen, nicht mehr kristallisierenden Mutterlaugen wogen nach dem Trocknen noch 1,128 g.

Die Fraktionen 24—31 kristallisierten nicht, sie wogen zusammen 0,657 g.

Fraktion 32 wog 2,383 g, Fraktion 33 0,604 g, die Fraktionen 34—36 zusammen noch 0,512 g. Das Totalgewicht aller eluierten Fraktionen betrug 7,5 g, sodaß in der Säule noch 3,5 g Substanz verblieben waren.

Zur Reinigung wurden 1,16 g des kristallisierten Glykosids in 35 cm^3 säurefreiem Methanol heiß gelöst, filtriert, auf ein kleines Volumen eingedampft und mit Benzol nicht ganz bis zur Trübung versetzt. Das Benzol hatte den Zweck, die noch in der Lösung vorhandenen Spuren von Schwefel in Lösung zu halten. Beim Animpfen kristallisierte das Glykosid in farblosen Nadeln, die nach einstündigem Stehen mit Methanol-Benzol, dann mit Benzol und Aether gewaschen wurden. Erhalten wurden 0,892 g reiner Kristalle vom Smp. 132—134°. Die Mutterlauge gab noch 190 mg derselben Reinheit. Zur Analyse wurde eine Probe aus Methanol-Wasser, dann nochmals aus Methanol-Benzol umkristallisiert und zunächst im Exsikkator über Chlorkalzium ohne Vakuum getrocknet. Der Smp. war unverändert.

5,381 mg Subst. gaben bei 80° im Hochvak. getr. 0,099 mg Gewichtsverlust.
5,282 mg „ (getrocknet) gaben 12,53 mg CO_2 und 3,99 mg H_2O (Schoe.)
2,519 mg „ (ungetrockn.) „ 1,815 mg AgJ (Zeisel) (Schoe.)
4,762 mg „ (getrocknet) „ 2,515 mg AgJ „ (Schoe.)

$C_{30}H_{44}O_9$	(548,65)	Ber. C 65,66 H 8,09	$-OCH_3$ 5,65%
$C_{30}H_{44}O_9 . CH_3OH$	(580,69)	Ber. C 64,12 H 8,37	$-OCH_3$ 10,7 %
	lufttrocken	Gef.	$-OCH_3$ 9,52%
	hochvakuumgetrocknet	Gef. C 64,73 H 8,45	$-OCH_3$ 6,98%

Lactontitration. 22,6 mg ± 0,2 mg Subst. gaben beim Trocknen im Hochvakuum bis zur Gewichtskonstanz 0,8 mg ± 0,2 mg Gewichtsverlust. Für die Verseifung wurde mit einer gewogenen Menge methylalkoholischer Kalilauge zwei Stunden unter Rückfluß (Verschluß mit Natronkalkrohr) gekocht und nach dem Abkühlen und Zusatz von Phenolphthalein mit $\frac{n}{50}$ Salzsäure zurücktitriert.

Als Vergleichswert diente eine genau gleich lang gekochte Probe derselben Lauge. 21,45 mg Glykosid verbrauchten 1,80 cm^3 $\frac{n}{50}$ Lauge. Gefunden Aequiv.-Gewicht 596. Das Produkt enthielt trotz der Trocknung sicherlich noch Kristall-Lösungsmittel, daher der zu hohe Wert. Die spezifische Drehung betrug: $[\alpha]_D^{15} = +35{,}4° \pm 2°$ (c = 1,896 in abs. Alkohol).

19,2 mg ± 0,2 mg Subst. zu 1,0125 cm^3; $l = 1$ dm; $\alpha_D^{15} = +0{,}67° \pm 0{,}02°$.

Jacobs und *Hoffmann*[33] fanden für Cymarin verschiedener Provenienz $[\alpha]_D^{20}$ + 35,0° und 37,8° (in Chloroform), bzw. + 34,9° und 37,5° (in Al-

[33] *W. A. Jacobs* und *A. Hoffmann*, J. biol. Chem. *67*, 609 (1926).

kohol). Als Smp. des Cymarins finden sich in der Literatur verschiedene Werte, je nach Vorbehandlung (vgl. [33]). Die von Herrn Dr. W. A. *Jacobs* erhaltene Probe wurde aus Methanol-Benzol umkristallisiert und schmolz auf dem Koflerblock genau wie das aus Adonis vernalis isolierte Produkt bei 132—134° (langsam erhitzt), die Mischprobe gab keine Depression. Beide Substanzproben reduzierten in einer Spur Methanol gelöst alkalische Silberdiammin-Lösung bei Zimmertemperatur nach etwa 2 Minuten deutlich. Die Legalprobe sowie die Keller-Kiliani-Reaktion waren stark positiv.

Azetat des Glykosids

100 mg Glykosid wurden in 200 mg abs. Pyridin gelöst, mit 150 mg Azetanhydrid versetzt, 16 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen und anschließend noch 1 Stunde auf 60° erwärmt. Dann wurde im Vakuum eingedampft, der Rückstand in Benzol aufgenommen, mit verdünnter Salzsäure, Sodalösung und Wasser gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und eingedampft. Das Rohprodukt wog 112 mg. Es wurde aus Azeton-Aether umkristallisiert. Das Produkt schmolz auch nach mehrmaligem Umkristallisieren immer unscharf bei 154—164°, worauf es oft teilweise wieder erstarrte, um gegen 200° endgültig zu schmelzen. Daher wurde die ganze Menge über eine kleine Säule von 3 g Aluminiumoxyd chromatographisch gereinigt. Aus den mit Benzol-Chloroform erhaltenen Eluaten wurden durch Umkristallisieren aus Methanol-Aether farblose Kristalle gewonnen, die bei 160—162° schmolzen. Bei langsamem Erhitzen trat gegen 150° Sintern ein, und öfters konnte nach dem Schmelzen teilweises Erstarren beobachtet werden. Zur Analyse wurde 1 Stunde im Hochvakuum bei 80° getrocknet.

5,229 mg Subst. gaben 12,340 mg CO_2 und 3,360 mg H_2O (Schoe.)
$C_{32}H_{46}O_{10}$ (590,69) Ber. C 65,06 H 7,85%
Gef. C 64,40 H 7,83%.

Die spezifische Drehung betrug: $[\alpha]_D^{18} = +49{,}3° \pm 2°$ (c = 1,926 in abs. Alkohol). 19,5 mg ± 0,2 mg Subst. zu 1,0125 cm³; $l = 1$ dm; $\alpha_D^{18} = +0{,}95° \pm 0{,}02°$. *Jacobs* und *Hoffmann*[33] geben als Smp. für Cymarinazetat 160—161° an. *Stoll* und Mitarb.[27] fanden als spez. Drehung des Cymarinazetates: $[\alpha]_D^{20} = +49{,}4°$ (Alkohol). Eine zum Vergleich aus authentischem Cymarin bereitete Probe von Cymarinazetat schmolz bei 160—163°. Die Mischprobe gab keine Schmelzpunktserniedrigung.

Spaltung des Glykosids

900 mg des reinen Glykosids wurden in 45 cm³ Methanol heiß gelöst, mit 45 cm³ $\frac{n}{10}$-wäßriger Schwefelsäure versetzt und 30 Minuten unter Rückfluß gekocht. Die Mischung, die zuerst Fehlingsche Lösung nicht reduzierte, hatte die maximale Reduktionskraft bereits nach 15 Minuten

langem Kochen erreicht. Hierauf wurde im Vakuum auf 50 cm³ eingeengt und die klare Lösung bei 0° stehen gelassen. Nach einigen Tagen hatte sich eine reichliche Menge grober, glänzender Kristalle abgeschieden, die abgenutscht, mehrmals mit Wasser gewaschen und im Vakuum getrocknet wurden. Sie schmolzen bei mikroskopischer Betrachtung auf dem Koflerblock bei 134—136°, erstarrten hierauf meistens, um bei 220—230° endgültig zu schmelzen. Die Ausbeute betrug 415 mg. Die Mutterlaugen und Waschwässer wurden im Vakuum wieder auf etwa 50 cm³ eingeengt, dreimal mit Chloroform und dann noch zweimal mit Aether ausgeschüttelt. Die mit Natriumsulfat getrockneten Auszüge wurden vereinigt und gaben beim Eindampfen einen geringen Rückstand, der nach Umkristallisieren aus Methanol-Wasser noch eine kleine Menge Kristalle ergab, die sich als identisch mit dem oben genannten Aglukon erwiesen.

Die ausgeschüttelte wäßrige Lösung wurde im Vakuum von Aetherresten befreit, mit frisch aus Bariumhydroxyd mit Kohlendioxyd gefälltem Bariumkarbonat heiß neutralisiert und über eine Spur Kohle klar filtriert. Das wasserhelle Filtrat wurde nach Zusatz von etwa 50 mg feuchtem Bariumkarbonat im Vakuum vollständig eingedampft. Der Rückstand wurde in Azeton aufgenommen und filtriert. Das Filtrat wurde im Vakuum eingedampft und gut getrocknet. Der verbliebene Sirup wurde mehrmals mit warmem abs. Aether ausgezogen, wobei die Hauptmenge in Lösung ging, nur ein kleiner harziger Rest blieb ungelöst. Die klaren Aetherlösungen wurden vereinigt und eingedampft. Es verblieb ein farbloser, amorpher Rückstand, der 108 mg wog und im Exsikkator über Chlorkalzium stehen gelassen wurde. Nach mehreren Tagen erstarrte er vollständig zu einer Kristallmasse.

Untersuchung des Aglukons

Eine Probe des Aglukons wurde aus Aethanol-Wasser umkristallisiert, mit Wasser gewaschen und 16 Stunden über Chlorkalzium ohne Vakuum getrocknet. Sie schmolz bei mikroskopischer Betrachtung auf dem Koflerblock bei 136–138°, erstarrte dann meist wieder, um endgültig bei 220–230° zu schmelzen. Bei der Bestimmung im Röhrchen schmolz sie bei 170° unter Aufschäumen. Zur Analyse wurde unmittelbar vor der Verbrennung bei 80° im Hochvakuum getrocknet.

4,833 mg Subst. bei 80° im Hochvakuum getrocknet gaben 0,098 mg Gewichtsverlust = 2,03%.

4,735 mg Subst. gaben 11,635 mg CO_2 und 3,460 mg H_2O (Schoe.)

21,3 mg ± 0,2 mg Subst. verbrauchten 2,64 cm³ $\frac{n}{50}$ Lauge

$C_{23}H_{32}O_6$ (404,49) Ber. C 68,29 H 7,98% Aequiv.-Gew. 404,5
Gef. C 67,06 H 8,18% Aequiv.-Gew. 403

Das Produkt enthielt offenbar immer noch etwas Wasser. Es erwies sich als frei von Methoxyl.

Die spezifische Drehung betrug: $[\alpha]_D^{17}$ = + 40,8° ± 2° (c = 1,962 in abs. Alkohol). 19,6 mg ± 0,2 mg Subst. (im Hochvakuum bei 80° getrocknet) zu 0,9994 cm³; l = 1 dm; α_D^{17} = + 0,80° ± 0,02°. Eine aus Cy-

marin bereitete Probe von Strophanthidin zeigte unter dem Mikroskop einen Smp. von 136 –138° meist unter Wiedererstarren und erneutem Schmelzen bei 220 bis 230°. Die Mischprobe gab keine Depression. Bei der Bestimmung im Röhrchen schmolz auch diese Probe erst bei 170° unter Aufschäumen. *Jacobs* und *Hoffmann*[33] geben als Drehung des Strophanthidins an: $[\alpha]_D^{22} = +41{,}9°$ (c = 1,98 in Methanol).

iso-Verbindung. Die bei der Lactontitration des Genins und seines Azetats erhaltenen Lösungen wurden mit Salzsäure bis zur kongosauren Reaktion versetzt und im Vakuum von Methanol befreit. Der dabei kristallin ausfallende Stoff wurde mit Chloroform, dann mit Aether ausgeschüttelt und die vereinigten Auszüge durch mehrmaliges Waschen mit Sodalösung von Phenolphthalein befreit, mit Wasser gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und eingedampft. Der Rückstand wurde zuerst aus Methanol-Wasser, dann aus Benzol-Pentan und schließlich aus wenig abs. Alkohol umkristallisiert und mit Aether gewaschen. Die glänzenden Blättchen schmolzen hierauf bei 226 bis 230° unter Zersetzung. Zur Analyse wurde im Hochvakuum bei 80° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

3,120 mg Subst. gaben 7,785 mg CO_2 und 2,155 mg H_2O (Schw.)
$C_{23}H_{32}O_6$ (404,49) Ber. C 68,29 H 7,98%
Gef. C 68,09 H 7,73%.

A. Windaus und *L. Hermanns*[34] fanden für iso-Strophanthidin einen Smp. von 239°.

Azetat des Genins. 227 mg Genin wurden in 2 cm³ abs. Pyridin gelöst, mit 1,5 cm³ Essigsäureanhydrid versetzt, zunächst 16 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen und anschließend noch eine Stunde auf 60° erwärmt. Dann wurde im Vakuum eingedampft. Der Rückstand wurde in Chloroform gelöst, die Mischung mit Aether verdünnt und mehrmals mit wäßriger Salzsäure, Sodalösung und Wasser gewaschen. Dabei kristallisierte in der Chloroform-Aether-Schicht bereits ein Teil des Azetates aus. Dieser wurde abgenutscht und mit Aether gewaschen. Die Mutterlauge wurde mit wenig Natriumsulfat kurz getrocknet und nach Zusatz von Benzol stark eingeengt, worauf Kristallisation eintrat. Die Kristalle wurden abgenutscht und mit Aether gewaschen. Die Mutterlauge gab nach Einengen und Zusatz von Aether noch eine kleine Menge Kristalle. Die Ausbeute betrug 217 mg Substanz vom Smp. 241 bis 244°. Zur Reinigung wurde aus Azeton unter Aetherzusatz umkristallisiert. Es wurden farblose Blättchen vom Smp. 246 bis 248° erhalten. Zur Analyse wurde im Hochvakuum bei 80° getrocknet.

5,025 mg Subst. gaben 12,385 mg CO_2 und 3,40 mg H_2O
21,3 mg ± 0,2 mg Subst. verbrauchten 4,52 cm³ $\frac{n}{50}$ Lauge.
$C_{25}H_{34}O_7$ (446,52) Ber. C 67,24 H 7,68% Aequiv.-Gewicht 223,3
Gef. C 67,26 H 7,66% Aequiv.-Gewicht 236.

[34] *A. Windaus, L. Hermanns*, Ber. *48*, 979 (1915).

Die spezifische Drehung betrug: $[\alpha]_D^{18} = +55{,}8° \pm 5°$ (c = 1,021 in Chloroform). 25,8 mg ± 0,2 mg Subst. zu 2,526 cm³; $l = 1$ dm; $\alpha_D^{18} = +0{,}57° \pm 0{,}04°$. Eine aus authentischem Strophanthidin bereitete Probe Azetyl-Strophanthidin zeigte denselben Smp., und die Mischprobe gab keine Depression. In der Literatur[35] wird für Strophanthidinazetat ein Smp. von 248 bis 249° angegeben.

Untersuchung des Zuckers

Das rohe Kristallisat wurde im Molekularkolben bei 0,01 mm Druck und 80° Badtemperatur destilliert, wobei ein sehr geringer Rückstand hinterblieb. Das amorphe Destillat wurde in abs. Aether gelöst, auf ein kleines Volumen eingeengt, angeimpft und mehrere Stunden gut verschlossen stehen gelassen. Nachdem die Hauptmenge auskristallisiert war, wurde mit Pentan nicht ganz bis zur Trübung versetzt und die Abscheidung durch einstündiges Stehen vervollständigt. Die farblosen Nadeln wurden zuerst mit abs. Aether, dann mit Aether-Pentan gewaschen und im Exsikkator über Chlorkalzium (ohne Vakuum) getrocknet. Sie schmolzen bei 88 bis 91°. Ein von Herrn Prof. Stoll freundlichst zur Verfügung gestelltes Präparat authentischer Cymarose schmolz gleich, und die Mischprobe gab keine Schmelzpunkt-Erniedrigung. Die spezifische Drehung betrug: $[\alpha]_D^{20} = +52{,}2° \pm 2{,}5°$ (c = 2,071 in Wasser). 20,7 mg ± 0,2 mg Subst. zu 0,9996 cm³; $l = 1$ dm; $\alpha_D^{20} = +1{,}09° \pm 0{,}02°$. Zur Analyse wurde unmittelbar vor der Verbrennung im Hochvakuum über Phosphorpentoxyd bei Zimmertemperatur getrocknet.

3,294 mg Subst. gaben 6,270 mg CO_2 und 2,560 H_2O (Schoe.)
$C_7H_{14}O_4$ (162,18) Ber. C 51,82 H 8,70%
Gef. C 51,94 H 8,70%

Jacobs und *Hoffmann* fanden für Cymarose $[\alpha]_D^{21} = +53{,}4°$ (Wasser).

3. Trennung des wasserlöslichen Anteils („Adonidosid„-Fraktion)

Die wie früher beschrieben durchgeführte Trennung von 45 g «Adovern»-Substanz gab 18 g wasserlösliche Anteile als hellbraunes Harz. Diese wurden in 270 cm³ Wasser gelöst und die Lösung dreimal mit einer Mischung von je 270 cm³ frisch dest. Chloroform und 125 cm³ 96proz. Alkohol ausgeschüttelt. Beim Eindampfen der über Natriumsulfat getrockneten alkoholhaltigen Chloroformlösung verblieb ein Rückstand von 6,1 g («Fraktion B»). Die gegen Lackmus genau neutralisierte wäßrige Lösung dampfte man im Vakuum bei 30° ein und erhielt 11,5 g «Fraktion C».

[35] DRP. 506 046, Kl. 12 o vom 6. 4. 1928, DRP. 508 096 (Zus.-Pat.) Kl. 12 o vom 1. 1. 1920. Schw. P. 140 534 vom 18. 3. 1929. Schering-Kahlbaum AG.

4. Aufarbeitung der „Fraktion B"

6,1 g «Fraktion B» wurden in 45 cm³ abs. Pyridin gelöst, mit 30 cm³ Essigsäureanhydrid versetzt, 24 Stunden bei Zimmertemperatur stehengelassen und anschließend noch 1 Stunde auf 60° erwärmt. Hierauf dampfte man im Vakuum ein, löste den Rückstand in Benzol auf, schüttelte die Benzollösung mehrmals mit verdünnter Salzsäure, Sodalösung und Wasser aus, trocknete sie über Natriumsulfat und dampfte im Vakuum ein. Erhalten wurden 6,6 g azetyliertes Produkt, das in abs. Benzol gelöst und durch eine mit Benzol bereitete Säule von 165 g Aluminiumoxyd (Merck, standardisiert nach Brockmann) filtriert wurde. Zum Nachwaschen dienten die in der folgenden Tabelle genannten Lösungsmittel.

Fraktions-Nr.	Menge	Lösungsmittel	
1—3	je 750 cm³	abs. Benzol	
4—5	je 750 cm³	Benzol-Aether	(9 : 1)
6—12	je 750 cm³	Benzol-Aether	(1 : 1)
13—14	je 750 cm³	Benzol-Chloroform	(9 : 1)
15—17	je 750 cm³	Benzol-Chloroform	(4 : 1)
18	je 750 cm³	Benzol-Chloroform	(1 : 1)
19	1750 cm³	Benzol-Chloroform	(1 : 1)
20—23	je 750 cm³	Benzol-Chloroform	(1 : 3)
24	1500 cm³	Benzol-Chloroform	(1 : 3)
25—29	je 750 cm³	reines Chloroform	
30—32	je 750 cm³	Chloroform-Methanol	(49 : 1)
33	750 cm³	Chloroform-Methanol	(19 : 1)
34	750 cm³	Chloroform-Methanol	(9 : 1)
35	1500 cm³	Chloroform-Methanol	(7 : 3)
36	750 cm³	Chloroform-Methanol	(7 : 3)

Isolierung des niedrig schmelzenden Azetats (Azetat des wirksamen Glykosids)

Aus den Fraktionen 14—18 erhielt man nach längerem Stehen Kristalle, die nach Waschen mit abs. Aether unter Zusatz von etwas Azeton 220 mg wogen und bei 136—140° zu einer sehr dickflüssigen Masse zusammenschmolzen. Zweimaliges Umkristallisieren aus Azeton-Aether lieferte farblose, zu Rosetten vereinigte Nadeln, die bei langsamem Erhitzen bei 146—148° schmolzen und eine spez. Drehung von $[\alpha]_D^{16} = -56{,}5° \pm 2{,}5°$ (c = 0,956 in Chloroform) zeigten.

9,56 mg Subst. zu 0,9994 cm³; $l = 1$ dm; $\alpha_D^{16} = -0{,}54° \pm 0{,}02°$.

Zur Analyse wurde im Hochvakuum bei 80°, bzw. 100° getrocknet.
3,822 mg Subst. (bei 80° getr.) gaben 8,520 mg CO_2 u. 2,47 mg H_2O (ETH.)
3,800 mg Subst. (bei 100° getr.) gaben 8,488 mg CO_2 u. 2,405 mg H_2O (ETH.)
4,655 mg Subst. verbr. 0,403 cm³ n/50-$Na_2S_2O_3$

Gef. C 60,83 H 7,23 OCH_3 0,90% (Zeisel)
Gef. C 60,96 H 7,08%

Zur Bestimmung des Aequivalent-Gewichtes wurde eine genau abgewogene Menge der bei 80° im Hochvakuum getrockneten Substanz mit einer gewogenen Menge überschüssiger 0,4proz. methylalkoholischer Natronlauge 4 Stunden unter Rückfluß gekocht (unter Verschluß mit einem Natronkalkrohr) und nach dem Erkalten mit n/50-Salzsäure bis zur Neutralisation gegen Phenolphthalein titriert. Als Vergleichswert diente eine ebenfalls gewogene, gleich lang erhitzte Probe derselben Lauge.

9,479; 9,723 mg Subst. verbr. 3,11; 3,07 cm³ n/50-NaOH
Gef. Aequiv.-Gewicht 152; 158

Auf die Berechnung einer passenden Formel wird vorläufig verzichtet.

Die Substanz zeigte eine stark positive Legalprobe, reduzierte, in wenig Methanol gelöst, alkalische Silberdiamminlösung bei Zimmertemperatur und gab mit konz. Schwefelsäure im ersten Moment eine gelbgrüne Färbung, die bald orange, dann blutrot wurde und schließlich über Karmin in Rötlichviolett überging.

Verseifung des niedrig schmelzenden Azetats (Freies Glykosid)

Nachdem Vorversuche mit Cymarin-Azetat ergeben hatten, daß sich dieses mit überschüssigem Kaliumhydrogen-Karbonat in methylalkoholisch-wäßriger Lösung bei Zimmertemperatur in guter Ausbeute zu Cymarin verseifen läßt, ohne daß Isomerisierung eintritt, wurden 170 mg des bei 146—148° schmelzenden Glykosid-Azetats zur Abspaltung der Azetylgruppen in 25 cm³ Methanol gelöst und nach Zusatz einer Lösung von 170 mg $KHCO_3$ in 8,5 cm³ Wasser 6 Tage bei 20° stehen gelassen. Dann wurde die klare, intensiv bitter schmeckende Lösung im Vakuum auf 5 cm³ eingedampft, wobei sich eine Substanz in derben Kristallen abschied, die abgenutscht und mit wenig Wasser gewaschen wurde. Aus der Mutterlauge konnte durch weiteres Einengen noch eine zweite Kristallfraktion erhalten werden. Beide Anteile schmolzen bei 246—248° unter Zersetzung und wogen zusammen etwa 50 mg. Die verbleibende wäßrige Lösung wurde hierauf noch mehrmals mit alkoholhaltigem Chloroform ausgeschüttelt. Beim Verdampfen der Auszüge wurde noch etwas Sirup erhalten, aus dem sich jedoch keine Kristalle mehr abschieden. Zur Analyse wurden die Rohkristalle zunächst aus Methanol und dann nochmals aus abs. Alkohol umkristallisiert und mit Benzol und abs. Aether gewaschen. Sie schmolzen nun bei 263—265° (Zers.), wobei von 260° an Gelbfärbung auftrat. Die spez. Drehung betrug: $[\alpha]_D^{16} = -27° \pm 5°$; $[\alpha]_{5461}^{16} = -49{,}5° \pm 5°$ (c = 0,222 in Methanol).

5,548 mg Subst. (im Hochvakuum bei 60° getr.) zu 2,501 cm³; $l = 2$ dm; $\alpha_D^{16} = -0{,}12° \pm 0{,}02°$; $\alpha_{5461}^{16} = -0{,}22° \pm 0{,}02°$.

Unmittelbar vor der Verbrennung wurde 12 Std. lang im Hochvakuum bei 80° getrocknet.

3,738 mg Subst. gaben 8,603 mg CO_2 und 2,526 mg H_2O (ETH.)

Gef. C 62, 81 H 7,56%.

Die Bestimmung des Aequivalent-Gewichts geschah in gleicher Weise wie diejenige des Azetats, wobei jedoch nur 2 Stunden gekocht wurde.
8,517 mg Subst. (im Hochvak. bei 80° getr.) verbr. 0,74 cm³ n/50-NaOH

Aequiv.-Gewicht gef. 575 (± 50).

Die Substanz gab eine positive Legalprobe und reduzierte, in wenig Methanol gelöst, alkalische Silberdiamminlösung bei Zimmertemperatur. Bei der Keller-Kiliani-Reaktion entstand ein braunroter Ring, die Eisessigschicht färbte sich schwach grünlich[36]. Mit konz. Schwefelsäure trat in rascher Folge über Grüngelb, Orange, Blutrot eine karminrote Färbung ein, die nach einiger Zeit rötlich-violett und schließlich braunrot wurde.

Isolierung des hochschmelzenden Azetats

Die Fraktionen 21—24 wurden mit Aether versetzt und die darin unlöslichen Anteile durch Zusatz einer Spur Azeton in Lösung gebracht. Beim Stehen trat spontan Kristallisation ein. Die Kristalle der genannten Fraktionen wurden einzeln abgenutscht, mit Methanol und Aether gewaschen und im Vakuum getrocknet. Alle schmolzen bei etwa 235—240° unter Gelbfärbung. Bei der Mischprobe gaben jedoch die Kristalle aus den Fraktionen 21 und 22 eine starke Schmelzpunktserniedrigung, während die Kristalle aus den Fraktionen 22—24 untereinander bei der Mischprobe keine Depression aufwiesen. Es wurden daher die Kristalle der Fraktionen 22—24 (165 mg) vereinigt und aus Methanol-Aether-Benzol umkristallisiert. Die mit Aether und Petroläther gewaschene Substanz schmolz bei 237—238° (Zers.) und zeigte eine spez. Drehung von: $[\alpha]_D^{14} = +30{,}4° \pm 3°$, bzw. $[\alpha]_{5461}^{13} = +33{,}1° \pm 3°$ (c = 1,119 in Chloroform).

11,18 mg Subst. (1 Std. im Hochvakuum bei 60° getr.) zu 0,9994 cm³; $l = 1$ dm; $\alpha_D^{14} = +0{,}34° \pm 0{,}02°$; $\alpha_{5461}^{13} = +0{,}37° \pm 0{,}02°$.

Zur Analyse wurde im Hochvakuum bei 80° getrocknet.

5,014 mg Subst. gaben 11,760 mg CO_2 und 3,320 mg H_2O (Schoe.)
3,931 mg Subst. gaben 0,00 mg AgJ (Zeisel) (Schoe.)

$C_{27}H_{36}O_9$ (504,56) Ber. C 64,27 H 7,19% Aequiv.-Gew. (für Diazetat) 168
$C_{27}H_{38}O_9$ (506,57) Ber. C 64,01 H 7,56% Aequiv.-Gew. (für Diazetat) 169
Gef. C 64,01 H 7,41%

Die Bestimmung des Aequivalent-Gewichts wurde in gleicher Weise wie beim niedrig schmelzenden Azetat vorgenommen.
9,82 mg Subst. verbr. 2,61 cm³ n/50-NaOH

Aequiv.-Gew. gef. 189

Die Substanz gab eine positive Legalprobe, reduzierte in Methanol

[36] Nach *W. Karrer* (l. c.) ist die grüne Färbung des Eisessigs bei der Keller-Kiliani-Reaktion des «Adonidosids» charakteristisch.

gelöst alkalische Silberdiamminlösung bei Zimmertemperatur und färbte konz. Schwefelsäure allmählich gelblich, dann braungelb und schließlich rötlich-violett.

Verseifung des hochschmelzenden Azetats

100 mg reines Azetat vom Smp. 237—238° wurden in 25 cm³ Methanol gelöst, mit einer Lösung von 100 mg $KHCO_3$ in 5 cm³ dest. Wasser versetzt und 6 Tage lang bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Hierauf dampfte man im Vakuum auf ein kleines Volumen (etwa 1 cm³) ein und schüttelte die wässerige Lösung, aus der sich auch beim Abkühlen keine Kristalle abschieden, etwa 30mal mit viel Chloroform aus. Die aus den vereinigten eingedampften Chloroformlösungen auskristallisierende Substanz wurde aus abs. Alkohol umkristallisiert und die Kristalle mit einer Mischung von Alkohol—Benzol und dann mit Benzol und abs. Aether gewaschen. Sie zeigten einen Smp. von 238—240° (Zers.). Zur Analyse wurde nochmals aus Azeton—Aether umkristallisiert und unmittelbar vor der Verbrennung im Hochvakuum bei 100° getrocknet.

5,139 mg Subst. gaben 12,405 mg CO_2 und 3,550 mg H_2O (Schoe.)
$C_{23}H_{34}O_7$ (422,50) Ber. C 65,38 H 8,10%
$C_{23}H_{32}O_7$ (420,48) Ber. C 65,72 H 7,67%
Gef. C 65,87 H 7,73%.

Die spez. Drehung betrug: $[\alpha]_D^{15} = +53° \pm 2°$; $[\alpha]_{5461}^{15} = +67° \pm 2°$ (c = 1,00 in abs. Alkohol).
9,994 mg Subst. (im Hochvakuum bei 70° getr.) zu 0,9994 cm³; $l = 1$ dm; $\alpha_D^{15} = +0{,}53° \pm 0{,}02°$; $\alpha_{5461}^{15} = +0{,}67° \pm 0{,}02°$.

Sowohl die Legalprobe als auch die Reduktionsprobe mit Silberdiamminlösung fielen positiv aus. Bei der Keller-Kiliani-Reaktion bildete sich an der Berührungszone ein prächtig roter Ring; die Essigschicht war gelblich gefärbt. Mit konz. Schwefelsäure allein entstand sofort eine orangerote Färbung, die allmählich rötlich-violett wurde.

5. Aufarbeitung der „Fraktion C"

11,5 g «Fraktion C» wurden in 50 cm³ Essigsäureanhydrid und 60 cm³ Pyridin gelöst und nach 12stündigem Stehen bei Zimmertemperatur noch 2 Stunden auf 60° erwärmt. Dann wurde das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert, der Rückstand in Benzol aufgenommen (2 g harzige Anteile blieben ungelöst) und die benzolische Lösung mit verdünnter Sodalösung, Salzsäure und Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und eingedampft. Der Rückstand wog 10,8 g. Er wurde zusammen mit den genannten 2 g unlöslichen Anteilen über eine Säule von 360 g Aluminiumoxyd (Merck, standardisiert nach Brockmann) chromatographisch getrennt. Zum Nachwaschen dienten je 1000 cm³ der in der folgenden Tabelle genannten Lösungsmittel.

Fraktions-Nr.	Lösungsmittel	
1—2	abs. Benzol	
3—4	Benzol-Aether	(1 : 1)
5--7	Benzol-Chloroform	(4 : 1)
8—13	Benzol-Chloroform	(1 : 1)
14—17	Benzol-Chloroform	(1 : 3)
18—21	Chloroform	
22	Chloroform-Aethanol	(99 : 1)
23	Chloroform-Aethanol	(49 : 1)
24	Chloroform-Methanol	(19 : 1)
25	Chloroform-Methanol	(7 : 3)
26—27	Methanol	

Isolierung eines Azetats vom Smp. 122—124°. Die Eindampfrückstände der Fraktionen 1—4 gaben beim Versetzen mit Azeton—Aether derbe Kristalle, die nach dem Waschen mit Aether bei 122—124° schmolzen. Die Ausbeute betrug nur etwa 30 mg. Die Substanz gab keine positive Legalprobe und wurde nicht weiter untersucht.

Isolierung eines Azetats vom Smp. 59—60°. Die Fraktionen 5—7 lieferten 250 mg eines bei 58—60° zu einer dickflüssigen Masse schmelzenden, bitter schmeckenden Kristallisats. Nach Umkristallisieren aus Aether—Petroläther sowie aus Benzol—Petroläther wurden farblose Plättchen erhalten, die bei 59—60° schmolzen. Die spez. Drehung betrug: $[\alpha]_D^{16} = +147° \pm 3°$; $[\alpha]_{5461}^{16} = +174° \pm 3°$ (c = 0,925 in Azeton).
9,244 mg Subst. (im Hochvakuum bei 70° getr.) zu 0,9994 cm³; $l = 1$ dm; $\alpha_D^{16} = +1{,}36° \pm 0{,}03°$; $\alpha_{5461}^{16} = +1{,}6° \pm 0{,}03°$.

Zur Analyse wurde im Hochvakuum bei Zimmertemperatur getrocknet und unmittelbar vor der Verbrennung im Vakuum bei 110° geschmolzen.
4,963 mg Subst. gaben 9,060 mg CO_2 und 2,56 mg H_2O (Schoe.)

$(C_3H_4O_2)_x$ $(73{,}07)_x$ Ber. C 50,0 H 5,60%
Gef. C 49,82 H 5,77%.

Die Substanz enthielt kein Methoxyl. Zur Bestimmung des Aequivalent-Gewichts wurde 3 Stunden mit überschüssiger methylalkoholischer Natronlauge unter Rückfluß gekocht und anschließend in der Hitze mit n/50-Salzsäure gegen Phenolphthalein zurücktitriert.
9,74 mg Subst. verbr. 5,70 cm³ n/50-NaOH

Aequiv.-Gewicht gef. 86.

Die Substanz gab keine positive Legalreaktion und reduzierte alkalische Silberdiamminlösung nicht. Auch mit konz. Schwefelsäure trat keine Farbreaktion ein. Möglicherweise handelt es sich um das Azetat eines Alkoholzuckers (Inosit?). Zur Verseifung wurden 100 mg des Azetats

(Smp. 59—60°) mit 10 cm^3 gesättigter methylalkoholischer Bariumhydroxydlösung ½ Stunde unter Rückfluß gekocht. Dann wurde mit der berechneten Menge verdünnter Schwefelsäure versetzt und zum Schluß genau ausgetüpfelt, sodaß schließlich weder Sulfat- noch Barium-Ionen nachweisbar waren. Man filtrierte vom Bariumsulfat ab und dampfte das sauer reagierende Filtrat im Vakuum ein. Der Rückstand zeigte auch nach dreimaligem Abdampfen mit Wasser immer noch saure Reaktion und konnte selbst nach langem Trocknen im Exsikkator nicht kristallisiert erhalten werden.

Weitere Trennung der amorphen Anteile. Außer den genannten Fraktionen konnten keine weiteren zur Kristallisation gebracht werden. Daher wurden alle Fraktionen, die positive Legalprobe gaben (Fraktion 9 bis Fraktion 23), vereinigt (3,5 g), in 300 cm^3 Methanol gelöst, mit der Lösung von 5,0 g $KHCO_3$ in 200 cm^3 Wasser versetzt und 8 Tage bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Dann dampfte man im Vakuum auf ein kleines Volumen ein, neutralisierte mit verdünnter Schwefelsäure, bis nur noch sehr schwach alkalische Reaktion vorhanden war, und schüttelte die wässerige Lösung mit dem doppelten Volumen Chloroform mehrmals aus. Die Chloroformauszüge wurden zweimal mit etwas Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und eingedampft. Sie hinterließen 0,23 g chloroformlösliche Anteile, die nicht weiter untersucht wurden. Die vereinigten wässerigen Lösungen wurden hierauf im Vakuum nochmals eingeengt und anschließend mehrmals mit der 1½fachen Menge Alkohol—Chloroform (1:2) ausgeschüttelt. Die mit wenig Sulfat getrockneten Auszüge hinterließen 0,57 g eines Gemisches, das der «Fraktion B» entsprach. Die verbleibende wässerige Lösung wurde im Vakuum eingedampft und hinterließ 0,9 g Rückstand (entspr. «Fraktion C»), aus dem sich Kristalle abschieden, die nach dem Waschen mit Methanol aus Methanol umkristallisiert wurden, bei 102—104° schmolzen und sich nach Mischprobe als Adonit erwiesen.

Die mit alkoholhaltigem Chloroform ausgeschüttelten Anteile (0,57 g entspr. «Fraktion B») wurden wie üblich azetyliert und chromatographiert. Aus den mit Benzol—Chloroform (1:1) eluierbaren Anteilen wurden etwa 10 mg eines Azetats isoliert, das bei 164—166° schmolz und bei der Mischprobe mit dem bei 146—148° schmelzenden Glykosid-Azetat keine Schmelzpunktserniedrigung ergab.

Die Mikroanalysen wurden teils im Mikroanalytischen Laboratorium der Eidgenössischen Technischen Hochschule, Zürich (Leitung *H. Gubser*) (ETH), teils von Herrn *Dr. A. Schoeller*, Berlin (Schoe.) und Herrn *Dr. O. Schwarzkopf*, Paris (Schw.) ausgeführt.

Curriculum vitae

Als Sohn des Hans *Rosenmund* und der Sophie, geb. Wild, wurde ich, Hans Rosenmund, am 26. Dezember 1913 in Liestal (Baselland) geboren. Ich besuchte daselbst die Primar- und Bezirksschule und trat 1929 in das Mathematisch - Naturwissenschaftliche Gymnasium in Basel ein, das ich 1933 mit dem Reifezeugnis verließ. Im gleichen Jahre immatrikulierte ich mich an der Philosophisch-naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Basel zum Studium der Pharmazie. Nach Abschluß des Fachstudiums und bestandenem Staatsexamen im Frühjahr 1939 begann ich unter der Leitung von Herrn Professor T. Reichstein die vorliegende Dissertation, die ich im Frühjahr 1942 abschloß.

Während meiner Studien besuchte ich die Vorlesungen und Uebungen bei den Herren Professoren und Dozenten:

R. Doerr, R. Flatt, Fr. Fichter, J. A. Häfliger, A. Hagenbach, A. Jetzler, K. Leupin, A. Portmann, T. Reichstein, E. Rothlin, H. Rupe, O. Schüepp, G. Senn, R. Viollier, W. Vischer, H. Zörnig.